

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成24年10月4日 (2012.10.4)

【公表番号】特表2009-508511(P2009-508511A)

【公表日】平成21年3月5日 (2009.3.5)

【年通号数】公開・登録公報2009-009

【出願番号】特願2008-531733(P2008-531733)

【国際特許分類】

C 1 2 N 5/07 (2010.01)

A 6 1 K 35/34 (2006.01)

A 6 1 P 9/10 (2006.01)

A 6 1 P 9/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 Z N A E

A 6 1 K 35/34

A 6 1 P 9/10 1 0 1

A 6 1 P 9/10

A 6 1 P 9/00

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 1 0 5

C 1 2 N 15/00 A

【誤訳訂正書】

【提出日】平成24年8月20日 (2012.8.20)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

In vitroにおける、ヒト筋生検細胞サンプルからの、もしくは、in vitroにおいて骨格筋細胞(hCMS)へと分化したヒト筋生検細胞からの、カルボニンおよびSM-MHCを発現するヒト平滑筋細胞(hCML)を本質的に含む細胞集団の獲得方法であって、該ヒト筋生検細胞はCD31およびCD14を発現せず、hCMSが、CD56、デスミン、ならびに、遺伝子MyoD、Myf5、およびミオゲニンから構成された遺伝子群内で選択された筋発生遺伝子を発現し、かつ多核筋管を発生させることができ、

以降のステップ：

A) 該筋芽ヒト筋生検細胞を、VEGFを含む培養培地で培養して、この培養が膀胱組織CML非存在下に実施され；

B) ステップA)において得られたhCMLの回収を含むことを特徴とする、方法。

【請求項 2】

前記ヒト筋生検細胞が、リンパ球マーカーBおよびTを発現しない、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

C D 5 6 およびデスミンを発現する h C M S が、遺伝子 M y o D、M y f 5、およびミオゲニンを発現することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

h C M S が、C D 3 4 および C D 1 4 を発現しないことを特徴とする、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 5】

h C M S が、カルボニンおよび S M - M H C を発現しないことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ A) で得られた h C M L が、カルボニンおよび S M - M H C を発現することを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ A) で得られた h C M L が、遺伝子 M y o D を発現しないことを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 8】

ステップ A) で得られた h C M L が、M y f 5 およびミオゲニンを発現することを特徴とする、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ A) で使用された培養培地が更に、P D G F - B B、I G F 1、F G F b、H G F、T N F、T G F、ならびに、C M L の増殖もしくは分化上での役割を持ち得る全ての他の因子から構成された成長因子群内で選択された少なくとも 1 種の成長因子を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 10】

h C M L が、骨格筋細胞 (h C M S) へと *i n v i t r o* において分化したヒト筋生検細胞サンプルから得られ、h C M S が、以降のステップ：

- a) 該筋生検のスライス；
- b) 前記繊維および筋細胞の酵素的解離ならびに濾過によるこれら個々の細胞の分離；
- c) こうして得られた筋起源細胞の、成長培地および / または分化培地存在下の接着細胞培養反応容器中での培養；
- d) 特異的細胞マーカー解析による、異なる培養段階において存在する細胞型の同定；
- e) 要求される細胞型が、該細胞集団内で優勢な割合である間の培養段階の選択；
- f) e) で選択された培養段階での細胞集団の回収；
- g) 必要な場合、ステップ f) において回収された細胞の凍結

のステップを含む方法により、ヒト筋生検細胞サンプルから得られていることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項 に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ c) の筋起源細胞の培養は、次いで、単数又は複数の伸長期が続く、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

ステップ b) において：

前記スライスの、培地 A における洗浄、次いで、該スライスの、遊離化酵素存在下での酵素的解離；

こうして得られた個々の細胞の、篩上での濾過、次いで、遠心による分離；

こうして得られた細胞滓の、培地 B 内での洗浄
が実施され；

ステップ c) において：

ステップ b) で得られた細胞の、培養プレート上での、培地 C における、20 ~ 50 % の集密度が得られるまでか、もしくは、第 1 筋管出現までの培養、次いで、これら細胞の、緩衝 P B S、S V F、次いで、培地 C における洗浄、培地 C における、大きくされたブ

レート単位上での、もしくは、多段階での、培養が新たに実施され得、約 90 % の集密度もしくは第 1 筋管出現を達成し；

これら細胞の回収前日に培養培地 C の除去、および、培地 D による置き換え；

こうして得られた細胞の、P B S における、次いで、培地 A における洗浄が実施され；

必要な場合、ステップ f) の終わりにおいて、こうして得られた細胞の、0.5 % (P / V) でのヒト血清アルブミンを用いて補完された培地 A における濃縮；

ステップ g) において、ステップ f) においてこうして得られた細胞の、凍結が、4 % (P / V) でのヒト血清アルブミンを用いて補完された培地 A において、および、7.5 % (V / V) での D M S O において実施され、これらの 37 °C での解凍、次いで、培地 A における洗浄後、これらのこの培養培地内での懸濁；

これらのステップにおいて、培地 A、B、C、および E が、以降；

培地 A：修飾 M C D B 1 2 0 培地 (H a m r a、1988 年)：D - バリンによる L - バリン置換；フェノール赤 (レッド) およびチミジン除去；

培地 B：培地 A + 20 % 照射牛胎児血清 + 抗生物質；

培地 C：培地 B + F G F b (10 ng / mL) + 1 μ M でのデキサメタゾン；

溶液もしくは培地 D：燐酸緩衝化生理食塩水 (P B S)

である

ことを特徴とする、請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】

要求される h C M S 細胞型が、前記細胞集団の有意な割合である間の前記培養段階が、一般集団の少なくとも 50 % である C D 5 6 + 表現型細胞集団の出現により求められることを特徴とする、請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 14】

一般集団の少なくとも 50 % である、前記 C D 5 6 + 表現型細胞集団が更に、C D 1 0 +、C D 1 3 +、デスミン +、およびクラス 1 H L A から構成された表現型群において選択された、少なくとも 1 種の表現型、好ましくは少なくとも 2 種、3 種、および 4 種の表現型を保有する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 h C M L が、i n v i t r o で骨格筋細胞 (h C M S) へと分化したヒト筋生検細胞サンプルから得られ、ステップ A) において、V E G F を含む前記培養培地が、D - バリンによる L - バリン置換、フェノール赤 (レッド) 除去、およびチミジン除去により修飾された M C D B 1 2 0 培地であることを特徴とする、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 h C M L が、ヒト筋生検細胞サンプルから得られ、ステップ A) において、V E G F を含む前記培養培地が、M 1 9 9 培地であることを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 17】

ステップ A) において、前記培養培地が、10 ng / mL の V E G F を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 18】

前記 h C M L が、直接得られる、もしくは、予め h C M S へと分化したヒト筋生検は、採取が行われる個体のいずれかの筋領域内で採取された生検であることを特徴とする、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 19】

複数の前記 h C M L が、直接得られる、もしくは、予め h C M S へと分化したヒト筋生検が、採取が実施されている個体の脚筋領域内で採取された生検であることを特徴とする、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 20】

前記 h C M L が、直接得られる、もしくは、予め h C M S へと分化したヒト筋生検が、採取が実施されている小児もしくは成人の個体の筋領域内で採取された生検であることを特徴とする、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【誤訳訂正 2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】ヒト平滑筋細胞の獲得方法およびヒト平滑筋細胞の適用

【技術分野】

【0001】

本発明は、*in vitro*における、カルボニンおよび S M - M H C を発現するヒト平滑筋細胞 (h C M L) を本質的に含む細胞集団の、ヒト筋生検サンプルからの、もしくは、*in vitro*において骨格筋細胞 (h C M S) へと分化したヒト筋生検サンプルからの、獲得方法に関する。本発明は、本方法により得られる単離平滑筋細胞を、ヒト用に向けた治療成分として含む組成物にも関する。本発明は更に、これら単離された平滑筋細胞の、平滑筋細胞を置き換えるようにに向けた治療組成物を調製するための使用に関する。特に、本発明は、これら単離された平滑筋細胞の、虚血の、癌の、もしくは、損傷した組織の再灌流を必要としているいずれの疾患をも処置するための使用に関する。最後に、本発明は、これら平滑筋細胞の、活性成分を用いる治療を必要としているヒト用に向けた治療組成物を調製するための活性成分用ベクターとしての使用に関する。

【背景技術】

【0002】

平滑筋細胞 (C M L) および骨格筋細胞 (C M S) が、血管、腸管、および膀胱において存在し、臓器により使用され、機械的収縮機能を満たす 2 つのタイプの細胞である。C M L の起源が複雑であり、これらの位置 (ロケーション) に依る。実際、胚発生の間、C M L 前駆体は、3 系統：間葉細胞、神経畦細胞、もしくは、心外膜由来細胞からの起源たり得る。最近、末梢血において循環している C M L 始原細胞の存在が、観察されている。実際、異なる動物モデルが、(i) 新血管内膜形成、(i i) 動脈移植生成もしくは粥状硬化プラーク形成を研究するのに使用されたが、骨髓細胞において含有された始原細胞が、これらのプロセスにおいて参画すること、ならびに、これらが、C M L へと分化することを示すことを可能にしている。

【0003】

成人において、骨格筋細胞修復が、筋繊維基底層下の状況での単核筋原細胞たる衛星 (サテライト) 細胞集団により、実施されている。しかし、この細胞集団が、不均一であると思われる。更に、骨格筋から、フローサイトメトリーにより、これらの H o e c h s t 染料放出特性を使用して (1、2) 単離された他の万能細胞は、これらが、その骨髓が照射により破壊されているマウスに移植されている場合、全ての血液細胞へと分化することが可能である (2)。この細胞集団が、< < side population > > (S P) として知られている。これが、マーカー S c a 1 発現により、定義されている。しかしながら、これが、C D 3 4、c k i t、および C D 4 5 を発現しない。これらの細胞が、デスミン + 筋細胞へと、適切な培養条件 (1) において分化できる。他の研究が、高い細胞の < < 可塑性 > > 特性を有する骨格筋における前駆体細胞の存在を記載する (3)。これゆえ、骨格筋が、多様な万能特性を有する幾つかのタイプの幹細胞を含有するよう思われる。

【0004】

これらの幹細胞の分化特性およびこれらの培養におけるコントロール (制御) の画定が、これらの容易に単離された細胞を、処置、特に修復処置において使用するのを、可能とすると思われる。これらの細胞は、*ex vivo*において培養されたが、次いで、移植され得、血管病理 (虚血後再灌流、粥状 (アテローム) 硬化、腫瘍血管安定化等) 自家処

置用細胞処置産物を構成する。

【0005】

ラットSKMSの分化が既に、Hwang JH.らにより記載されており(4)、VEGF存在下に膀胱CMLとのCMSの同時培養に関与する方法を使用しており、この方法は、SMAを発現する分化CMSを得るのを可能にしている。

【0006】

番号WO03/027281の下に公開された国際特許出願(Sakurada Kazuhiro)に関するコメントも、なされ得、骨格筋間質組織を起源としている万能幹細胞集団の獲得を記載しており、神経、グリア細胞、心筋細胞、脂肪細胞、血管内皮細胞、血液細胞、骨細胞、軟骨細胞、脾細胞、および肝細胞へと分化できる。

【0007】

番号WO01/94555の下に公開された国際特許出願(J.P. Marolleea)に関するコメントも、なされ得、筋起源の特徴化された細胞集団の獲得方法およびこれらの使用を記載している。この文書が特に、細胞集団を、筋組織生検から、ヒトでの使用用の細胞療法産物調製のために、特に、移植による獲得方法を記載し、その優勢な細胞型が、CD56マーカーおよびクラスIHLAマーカーを発現し、心不全の医薬処置を強化する。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

これゆえ、*in vitro*における、平滑筋細胞(CML)を本質的に含む細胞集団の(特に、この集団を使用して処置されるべき個体もしくは患者からの筋組織サンプルからの)獲得方法を持つことが、望ましいと思われる。

【0009】

これが正に、本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0010】

これゆえ、第1態様における、本発明は、*in vitro*において、ヒト筋生検サンプルからの、もしくは、*in vitro*において骨格筋細胞(hCMS)へと分化したヒト筋生検からの、カルボニンおよび平滑筋ミオシン重鎖、ここで以後SM-MHCとして知られた、を発現しているヒト平滑筋細胞(hCML)を本質的に含む細胞集団の獲得方法に関し、これらヒト筋生検細胞が、CD31およびCD14、必要な場合、リンパ球マーカーBおよびTを発現しておらず、hCMSが、CD56、デスミン、ならびに、遺伝子MyoD、Myf5、およびミオゲニンにより構成された遺伝子群から選択された筋発生遺伝子を発現し、多核筋管を発生させることができ、以降のステップ：

A) これら筋芽ヒト筋生検細胞を、血管内皮成長因子(VEGF)、好ましくは、ヒトVEGFを含む培養培地で培養し、この培養が、好ましくは、膀胱CML非存在下に実施され；

B) ステップA)において得られたhCMLの回収を含むことを特徴とする。

【0011】

用語<<本質的に>>とは、表現<<本質的にヒト平滑筋細胞(hCML)を含む>>において使用された場合、本明細書において、特に、少なくとも、50%、好ましくは、少なくとも、60%、70%、75%、および80%のhCMLを、得られた細胞集団全体に関して含有する集団を意味すると理解される。

【0012】

好ましくは、本発明に従う方法は、CD56およびデスミンを発現するhCMSが、遺伝子MyoD、Myf5、およびミオゲニンを発現することを特徴としている。

【0013】

好ましくは、本発明に従う方法は、hCMSが、CD34およびCD14を発現しない

ことを特徴としている。

【 0 0 1 4 】

好ましくは、本発明に従う方法は、h C M S が、カルボニンおよび S M - M H C を発現しないことを特徴としている。

【 0 0 1 5 】

好ましくは、本発明に従う方法は、ステップ A) において得られた h C M L が、カルボニンおよび S M - M H C を発現することを特徴としている。

【 0 0 1 6 】

好ましくは、本発明に従う方法は、ステップ A) において得られた h C M L が、遺伝子 M y o D を発現しないことを特徴としている。

【 0 0 1 7 】

好ましくは、本発明に従う方法は、ステップ A) において i n v i t r o でヒト骨格筋細胞 (h C M S) へと分化したヒト筋生検から得られた h C M L が、C D 5 6 およびデスミンを、ステップ A) において使用された h C M S よりも、有意に少ない量で発現することを特徴としている。

【 0 0 1 8 】

好ましくは、本発明に従う方法は、ステップ A) において得られた h C M L が、M y f 5 およびミオゲニンを発現することを特徴としている。

【 0 0 1 9 】

好ましくは、本発明に従う方法は、ステップ A) において使用された培養培地が更に、血小板由来成長因子ホモダイマー B B (ホモダイマー b b と も言う。P D G F - B B)、1 型インシュリン成長因子 (I G F 1)、塩基性線維芽細胞成長因子 (F G F b)、肝細胞成長因子 (H G F)、腫瘍壊死因子 (T N F)、T G F、ならびに、C M L の増殖もしくは分化における役割を持ち得る全ての他の因子からなる成長因子群から選択された少なくとも 1 種の成長因子、好ましくはヒトのを含むことを特徴とする。

【 0 0 2 0 】

好ましくは、本発明に従う方法は、h C M L が、ステップ A) において、ヒト骨格筋細胞 (h C M S) へと i n v i t r o において分化したヒト筋生検細胞サンプルから得られたことを特徴としており、h C M S が、以降のステップ：

- a) 該筋生検のスライス；
- b) 前記繊維および筋細胞の酵素的解離ならびに濾過によるこれら個々の細胞の分離；
- c) こうして得られた筋細胞を、成長培地および / または分化培地存在下の接着細胞培養反応容器中の培養中に入れ、必要な場合、単数又は複数の伸長期が続き、；
- d) 特異的細胞マーカー解析による、異なる培養段階において存在する細胞型の同定；
- e) 要求される細胞型が、該細胞集団の優勢な集団である間の培養段階を選び、
- f) e) において選択された培養段階において細胞集団を回収し；
- g) 必要な場合、ステップ f) において回収された細胞の凍結 (特に、該細胞療法製品調製のために選ばれるべき培養段階で)、

ステップを含む方法により、ヒト筋生検細胞サンプルから得られることを特徴する。

【 0 0 2 1 】

前述の方法の好ましいモードに従い、以降が実施される。

ステップ b) において：

スライスを、培地 A において、洗浄し、次いで、該スライスを、遊離化酵素存在下に酵素的に解離させ；

こうして得られた個々の細胞を、篩上での濾過、次いで、遠心により、分離し；

こうして得られた細胞滓を、培地 B において、洗浄し；

ステップ c) において：

ステップ b) において、得られた細胞を、培養プレート上で、培地 C で、約 2 0 ~ 5 0 % の集密度が得られるか、もしくは、第 1 筋管出現まで培養し、次いで、これら細胞を、燐酸緩衝化生理食塩水 (P B S)、牛胎児血清 (S V F)、次いで、培地 C で、洗浄し、

ここで、培地 C における大きくされたもしくは多段階プレート単位（ユニット）上での培養が再び、実施され得、約 90 % の集密度もしくは第 1 筋管出現を達成し；

これら細胞を回収する前の日、培養培地 C を除去し、これを培地 D により置き換え；

こうして得られた細胞を、PBS において、次いで、培地 A において洗浄し；

必要な場合、ステップ f) の終わりにおいて；

こうして得られた細胞を、0.5 % (P / V) ヒト血清アルブミンを用いて補完された培地 A において濃縮し；

ステップ g) において；

ステップ f) においてこうして得られた細胞の凍結が、4 % (P / V) ヒト血清アルブミンを用いて補完された培地 A において、および、7.5 % (V / V) DMSO において実施され、これらを 37 °C において解凍し、次いで、培地 A における洗浄後、これらをこの培養培地に懸濁させ；

これらのステップにおいて、これら培地 A、B、C、および D が、番号 WO 01 / 94 555 の下で、2001 年 12 月 13 日に公開された国際特許出願（24 および 25 ページ）で定義されたとおりの培地であり、つまり；

培地 A：修飾 MCDB 120 培地（Hamra、1988 年）；D - バリンにより置換された L - バリン；フェノール赤（レッド）およびチミジン除去；

培地 B：培地 A + 20 % 照射牛胎児血清 + 抗生物質；

培地 C：培地 B + FGFb (10 ng / mL) + 1 μM デキサメタゾン；

溶液 D：燐酸緩衝化生理食塩水（PBS）

である。

【0022】

好ましくは、使用された抗生物質がゲンタマイシンであり、特に、50 μg / mL においてであり、もしくは、ペニシリンおよびストレプトマイシンの混合物である（特に、それぞれ、100 U I / mL および 100 μg / mL において）。

【0023】

更により好ましい実施形態において、本発明による方法が、該 hCML が、番号 WO 01 / 94 555 の下で公開された国際特許出願において記載されたような方法に従って得られた、予め hCMS へと分化したヒト筋生検細胞から得られ、本方法において、要求された hCMS 細胞型がその細胞集団の有意な割合である間の培養段階が、少なくとも、一般集団の 50 %、好ましくは、少なくとも、60 %、70 %、75 %、および 80 % である CD56 + 表現型集団の出現により求められていることを特徴としている。

【0024】

好ましくは、該 CD56 + 表現型細胞集団が、少なくとも、一般集団の 50 %、好ましくは、少なくとも、60 %、70 %、75 %、および 80 % であり、更に、CD10 +、CD13 +、デスミン +、クラス 1HLA から構成された表現型群において選択された、少なくとも 1 種の表現型、好ましくは、少なくとも 2 種、3 種、および 4 種の表現型を保有し、クラス 2HLA を発現していない。

【0025】

好ましい実施形態において、本発明に従う、in vitroにおいて本質的に hCML を含む細胞集団を得る方法は、本方法において、当該 hCML が in vitroにおいて骨格筋細胞（hCMS）へと分化したヒト筋生検細胞サンプルから得られ、ステップ A）において、VEGF を含むその培養培地が、Hamra により記載された MCDB 120 培地（in vitro Cell Dev. Biol., 24, 833 ~ 844, 1998 年）であり、D - バリンによる L - バリンの置換、フェノール赤（レッド）およびチミジン除去により修飾されたことを特徴としている。

【0026】

好ましい実施形態において、本発明に従う、in vitroにおいて本質的に hCML を含む細胞集団を得る方法は、本方法において、当該 hCML がヒト筋生検細胞サンプルから得られ、ステップ A）において、VEGF を含む該培養培地が、M199 培地（例

えば、培地 199、Gibco、Grand Island、NY)であることを特徴としている。

【0027】

好ましい実施形態において、本発明に従う、*in vitro*において本質的にhCMLを含む細胞集団を得る方法は、ステップA)において、該培養培地が10ng/mLのVEGFを含むことを特徴としている。

【0028】

同様に好ましい実施形態において、本発明に従う、*in vitro*において本質的にhCMLを含む細胞集団を得る方法は、当該hCMLが直接得られるかもしくは予めhCMSへと分化したヒト筋生検が、如何なる筋肉の領域からでも採取された生検であり、好ましくは、そのサンプルが採取された小児もしくは成人個体の脚筋からであることを特徴としている。

【0029】

もう1種別の態様において、本発明は、本発明の方法により得られる単離ヒト平滑筋細胞を含み、該単離ヒト平滑筋細胞が、カルボニンおよびSM-MHCを発現することを特徴としている。

【0030】

尚もう1種別の態様において、本発明が、ヒト筋生検サンプルからもしくは本発明の方法により骨格筋細胞へと*in vitro*において分化したヒト筋生検から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞を含む組成物に関し、薬剤として使用される。

【0031】

本発明が、ヒト筋生検サンプルからもしくは本発明の方法により骨格筋細胞へと*in vitro*において分化したヒト筋生検から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の使用、あるいは、本発明に従いながら、ヒトでの使用用治療組成物調製のための薬剤としての本組成物の使用も含み、特に、該方法のステップA)において培養された当該筋生検細胞が採取された個体を目的とする。

【0032】

好ましい実施形態において、該治療組成物が、CMLを、ヒトにおいて置換もしくは移植するよう向けられ、好ましくは、自家置換もしくは自家移植である。

【0033】

好ましくは、該治療組成物が、癌の予防もしくは処置用に向けられ、好ましくは、抗癌化学療法もしくは放射線療法処置の前もしくはと同時に投与される。

【0034】

これは、通常血管に対して、腫瘍血管が構造的におよび機能的に異なるからである。腫瘍血管特異的マーカーの同定が、これらの血管を、通常血管系を破壊することなく、標的とするのを可能とすると思われる(抗血管新生療法)(5)。多くの研究が、腫瘍血管内皮細胞(CE)における機能の変化を示している。そして、最近の結果が、血管周囲細胞(周細胞もしくはCML)が、表現型および機能の修飾(異常な形状、新たなマーカー発現、CEとの低い会合、細胞質の伸びを持っており、深くその腫瘍実質中に浸透する)を、腫瘍微小環境において受け(6-8)、こうして、抗血管新生療法用の新たな標的となっていくことを示す。固形腫瘍のこれらの生理病理学的な特徴が、従来の細胞毒性療法および標的化療法のデリバリーおよび効率を妥協させる。新たな治療アプローチが、ドラッグデリバリーを容易化させるために、腫瘍血管系を、それが破壊する前に通常にすると思われる(総説に関して(9)参照)。事実、最近の結果が、これら組み合わせられた治療を使用しながら、該腫瘍血管系の安定化および通常化後、腫瘍後退の効果を示す(10)。この腫瘍血管の安定化が、その腫瘍部位中にもしくは周りにCMLを注入することにより、実施され得ると考えられる。

【0035】

この治療アプローチ(腫瘍血管を通常化させることに鑑みて、本発明の方法により得られるもしくは直接得られる単離ヒトCMLを注入すること)が好ましくは、化学療法もし

くは放射線療法との組み合わせにおいてだけ実施されるべきである。この終わりに、C M L 注入がこれら抗癌処置の最大効果を可能とすると思われる期間の、<<治療濃度域>>が定義されなくてはならない。

【0036】

血管<<通常化>>が、より機能的なネットワークを確かにし、こうして、薬剤の局所的な拡散を高めていき、より均一な供給（デリバリー）を確かにし、ある特定の薬剤が作用するのが必要な腫瘍の酸素化を確かにする。これが、当該腫瘍における薬剤のより速くより広い作用を可能にし、こうして、投与された用量の減少が予め、2次効果（副作用）の深刻さおよび頻度を抑制する。最後に、これら作用のスピードおよび組み合わせが急速に、その増殖を制限し、こうして、その腫瘍耐性現象がしばしば観察された。

【0037】

本明細書において提案された細胞療法が、現在の処置を置き換えるように向けられた新しいタイプの処置を構成しないが、現在提供されている化学療法もしくは放射線療法に対する補完および/または潜在的相乗効果として使用される。

【0038】

好ましくは、また、該治療組成物が、虚血、特に、心臓もしくは下肢虚血の予防もしくは処置用に向けられる。

【0039】

多くの研究が、マウスおよびある幾つかのヒトのプロトコールにおいて実施されたが、骨髄細胞もしくは *in vitro* において分化した細胞を注入した後の虚血後再灌流の向上をハイライトしている（心臓もしくは下肢虚血）。現時点において、新生血管へのこれらの細胞の本当の統合が、問題とされているように思われるが、観察された基本の効果が本当である。更に、これらの過程（プロセス）における C M L の役割が、非常に重要たり得るであろう。最近の結果が、血管新生部位において、マウスへと、内皮細胞中にでなく、内皮周辺細胞中にだけ注入された骨髄細胞の分化を示す（11）。

【0040】

これゆえ、より具体的には、本発明の1目的が、本発明の方法による、ヒト筋生検細胞サンプルからもしくは *in vitro* において骨格筋細胞へと分化したヒト筋生検細胞から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の、腫瘍血管系もしくは虚血後再灌流<<通常化>>用に向けた組成物のための使用である。

【0041】

しかしながら、これらの細胞が、粥状（アテローム）硬化、慢性静脈疾患、血管悪性形成（血管腫瘍のような）用の治療使用に向けた薬剤としても、使用され得るであろう。

【0042】

この理由で、本発明の目的が、本発明の方法による、ヒト筋生検細胞サンプルからもしくは *in vitro* において骨格筋細胞へと分化したヒト筋生検細胞から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の、粥状（アテローム）硬化、動脈炎、慢性静脈疾患、もしくは血管悪性形成、特に血管腫瘍の予防もしくは処置用に向けた治療組成物調製のための使用でもある。

【0043】

最後に、血管新生部位に向かったこれらの転移特性により、これらの細胞が、薬剤、または、抗もしくは原血管新生因子のような治療活性成分をデリバリーするためのシャトルもしくはベクターとして使用され得る。

【0044】

これゆえ、もう1種別の特定の態様において、本発明の更なる目的は、本発明の方法による、ヒト筋生検細胞サンプルからもしくは *in vitro* において骨格筋細胞へと分化したヒト筋生検細胞から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の、薬剤としての、つまり、治療活性成分もしくは化合物投与用ベクターとしての使用であり：

該単離ヒト平滑筋細胞が形質転換され、こうして、該活性成分もしくは治療化合物を発現できるようになり；もしくは

該単離ヒト平滑筋細胞が修飾されており、投与されるよう必要とされている該活性成分もしくは治療化合物を含有することを特徴とする。

【0045】

本発明は、本発明の方法による、ヒト筋生検細胞サンプルからもしくは*in vitro*において骨格筋細胞へと分化したヒト筋生検細胞から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の、活性成分もしくは治療化合物による処置を必要とする疾患の予防もしくは処置用に向けた治療組成物調製のための使用も含み、これら細胞が、当該活性成分もしくは当該治療化合物を発現できるか、または、当該活性成分もしくは当該治療化合物を含有する。

【0046】

好ましくは、本発明の方法による、ヒト筋生検細胞からもしくは*in vitro*において骨格筋細胞へと分化したヒト筋生検細胞から得られるもしくは直接得られる単離ヒト平滑筋細胞の、治療組成物調製のための使用は、当該組成物が、静脈内経路により、もしくは、移植により、投与されることを特徴としている。

【0047】

続く図面および実施例のキャプションが、如何なる方法においても、その範囲を限定していくことなく、本発明を例示するよう向けられている。

【実施例】

【0048】

方法

細胞培養

臍帯血において含有された前駆体から*ex vivo*において分化したCMLが得られ、上記したとおりであった(16)。これらが、I型ラット尾コラーゲン(60 µg/mL、SIGMA)上で、20%の牛胎児血清(SVF)、25 mMのHepes緩衝液(Gibco)、抗生物質、抗真菌剤溶液(Gibco)、および、10 ng/mLでの組み換えhVEGF(R&D Systems)を用いて補完されたM199培地(Gibco)において、37 °Cにおいて、5% CO₂を含有している雰囲気において、培養された。該培養培地が、1週に2回、替えられている。本CMSが、以前記載されたとおり(12)培養された。筋管への細胞の分化を誘導させるために、80~90%での細胞の培養培地が、2% SVF、25 mM Hepes、ならびに、抗生物質および抗真菌剤溶液(Gibco)を用いて補完された培地へと変えられた。

【0049】

免疫細胞化学

これら細胞が培養において、スライド上で混合され(<<チャンバースライド>>、Lab-Tech、Poly Labo、ストラスブール、フランス)、冷90%アセトン溶液を用いて固定された。1次抗体が、使用された。マウス抗ヒトSMAモノクローナル抗体(1A4、DAKO)およびマウス抗ヒト平滑筋ミオシン重鎖モノクローナル抗体(SMMS-1、DAKO)。(DAKO) EnVisionTM System過酸化酵素(DAB)キットが使用され、SMAおよびSM-MHCを明らかにした。これら細胞が仕上げに、ヘマトキシリンを用いて対比染色された。

【0050】

フローサイトメトリー

ある1分取の細胞が直接、CD31(5.6E、Coulter)、CD45/CD14(2D1、MP9、Becton Dickinson)、CD56、およびCD90に対して向けられた抗体を用いて標識された。これら細胞が、抗デスミン抗体(D33、DAKO)を用いて、浸透試薬IntraprepTM(Coulter)を用いた浸透ステップ後、標識された。標識化後、これら細胞が、1%パラホルムアルデヒドを用いて固定され、フローサイトメトリー(FACStarフローサイトメーター、Becton Dickinson)により解析された。

R T - P C R (逆 転 写 ポ リ メ ラ ー ゼ 連 鎖 反 応)

合計RNAが、その供給元の説明書に従いながら、RNAxEL（登録商標）（Eurobio、Les Ulis、フランス）を用いて抽出された。そのcDNA合成が、キット<<RT-PCR（AMV）用第1鎖cDNA合成キット>>（Boehringer Mannheim）を使用して実施された。こうして、興味の対象のcDNA断片が、PCRにより、増幅されることができた。該PCR混合物が、1X反応緩衝液、1.5 mMのMgCl₂、0.2 mMのデオキシヌクレオチド混合物、0.5単位のTaqポリメラーゼ、ならびに、0.2 μMのセンスおよびアンチセンスプライマーを含有した。以降のプライマーが、該RT-PCRに使用された：

GAPDHセンス (配列ID番号: 1): 5' - C C A T G G A G A A G G C T
G G G G - 3'

アンチセンス (配列 ID 番号 : 2) : 5' - C A A A G T T G T C A T G G A T
G A C C - 3'

カルボニンセンス (配列 I D 番号 : 3) : 5' - A G A - A G T - A T G - A C C -
A C C - A G C - 3'

アンチセンス (配列 ID 番号 : 4) : 5' - T A G - A G C - C C A - A T G - A T
G - T T C - C G - 3'

SM22 センス (配列 ID 番号: 5) : 5' - G C A - G T C - C A A - A A T -
T G A - G A A - G A - 3'

アンチセンス (配列 I D 番号 : 6) : 5' - C T G - T T G - C T G - C C C - A T
T - T G A - A G - 3'

ミオゲニンセンス (配列 ID 番号 : 7) : 5' - A G C - G C C - C C C - T C G -
T G T - A T G - 3'

アンチセンス (配列 I D 番号 : 8) : 5' - T G T - C C C - C G G - C A A - C T
T - C A G - C - 3'

MyoDセンス (配列 I D 番号 : 9) : 5' - C G G - C G G - C G G - A A C - T
G C - T A C - G A A - 3'

アンチセンス (配列 I D 番号 : 10) : 5' - G G G - G C G - G G G - G C G - G
A A - A C T - T - 3'

Myf5 センス (配列 ID 番号: 11): 5' - ACC - ATG - GAT - CGG -
CGG - AAG - G - 3'

アンチセンス (配列 I D 番号 : 12) : 5' - A A T - C G G - T G C - T G C - C
A A - C T G - G A G - 3'

VEGF-R1 センス (配列 ID 番号: 13): 5' - CGA - CCT - TGG - T
TG - TGG - CTG - ACT - 3'

アンチセンス (配列 ID 番号: 14): 5' - CCC - TTC - TGG - TTG - G
T G - G C T - T T G - 3'

VEGF-R2 センス (配列 I D 番号 : 15) : 5' - AAC - AAA - GTC - G
GG - AGA - GGA - 3'

アンチセンス (配列 I D 番号 : 16) : 5' - T G A - C A A - G A A - G T A - G
C C - A G A - A G A - 3'

FRSセンス(配列ID番号:17): 5'-AGT-GTG-TGG-GGG-A
GA-TTC-TG-3'

アンチセンス (配列 ID 番号: 18): 5' - TCT - CCC - TAG - CAA - C
AG - CCC - TA - 3'

【 0 0 5 2 】

実施例 1：始原細胞もしくは分化骨格筋細胞から、大量のヒト C M L を得るのを可能にする培養条件

A) 出発細胞集団：

本発明の方法は、1種の優勢な細胞型が平滑筋型細胞である細胞集団の獲得方法に関する。この方法は、直接筋生検細胞に、もしくは、C M Sへの生検細胞の分化およびこれらの細胞の増幅の初期段階の後、適用され得る。これらの生検から筋生検およびC M Sを得ていく条件ならびにこれらの表現型の特徴化が、番号W O 0 1 / 9 4 5 5 5 の下で公開された国際特許出願 (J . P . M a r o l l e a u ら) において定義されている。更に、これら生検細胞が、C D 3 1 および C D 1 4 を発現しない。

【 0 0 5 3 】

数グラムの筋生検から開始して、数億個のC M Sを得るのが可能である。これらの細胞が、M y f 5 およびミオゲニンのような、C D 5 6、デスミン、および筋発生遺伝子を発現する。しかしながら、これらが、C D 3 4、C D 1 4、ならびに、カルボニンおよびS M - M H CのようなC M L特異的マーカーを発現しない。これらの細胞が、合着して、多核筋管を生じさせることができる。

【 0 0 5 4 】

B) 平滑筋細胞への骨格筋細胞の分化 :

該生検からの、もしくは、C M Sへの分化後の細胞が、M C D BもしくはM 1 9 9 培地において、V E G F単独存在下に、もしくは、他の成長因子 (P D G F - B B、I G F 1、F G F b、H G F、もしくはT N F) と共に、培養される。

【 0 0 5 5 】

使用された溶液および培地 :

培地 A :

修飾M C D B 1 2 0 培地 (H a m ら、1 9 8 8 年) : L - バリンが、D - バリンにより置換、フェノール赤 (レッド) およびチミジン除去。

培地 B :

培地 A + 2 0 % 照射牛胎児血清 + 抗生物質 (5 0 μ g / m L でのゲンタマイシンもしくはペニシリンに関して1 0 0 U I / m L もしくはストレプトマイシンに関して1 0 0 μ g / m L) 。

培地 C :

培地 B + F G F b (1 0 n g / m L) + 1 μ M デキサメタゾン。

溶液 D :

燐酸緩衝化生理食塩水 (P B S) (番号W O 0 1 / 9 4 5 5 5 の下で公開された国際特許出願 2 4 および 2 5 ページ参照) 。

培地 E :

M 1 9 9 。

培地 F :

M 1 9 9 + 2 0 % 補体除去牛胎児血清 + H e p e s (H e ' p e s、2 5 m M) + 抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン)。そして、必要な場合、抗真菌剤 (2 5 μ g / m L でのフングゾンのような、もしくは、上で指し示したとおり) 。

培地 G :

培地 F (M 1 9 9 + S V F + H e p e s + 抗生物質) + V E G F (1 0 n g / m L) 。

培地 H :

培地 B (M C D B + S V F + 抗生物質 + デキサメタゾン) + V E G F (1 0 n g / m L)

異なる成長因子を含有している培地が、上記された。

【 0 0 5 6 】

C M S もしくは C M L への分化と関連した遺伝子発現が、培養の間、逆転写後ポリメラー連鎖反応 (R T - P C R)、フローサイトメトリー、および免疫細胞化学により、解析された。これゆえ、V E G F を含有する培地 M 1 9 9 もしくは M C D B 1 2 0 における1ヶ月の培養後、これらの細胞が、メッセンジャーR N A、および、C M L に特異的な蛋白を発現する。こうして、これらが、カルボニンおよびS M - M H Cを発現する。平行して、これらが、デスミンおよびC D 5 6 を、遙かに弱く発現し、もはや全く、M y o D を発

現しない。しかしながら、転写因子 Myf5 およびミオゲニンの発現が、残る。

【0057】

本発明者らが、これらの表現型の修飾が、異なる機能特性に至ることも、示している。

【0058】

実施例2：平滑筋細胞への骨格筋細胞の分化：

筋生検細胞がまず、培養において、増殖のために、上記のような、FGFbを含有する培地に置かれた(12)。これらの細胞の表現型を特徴化させるために、フローサイトメトリーを使用しながらの解析(FACS)、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)、および、免疫細胞化学が、実施された。FACS解析は、殆どのこれらの細胞が、CD56(80.30+19.50%)、デスミン(92.30+8.48%)、およびCD90(91.32+10.19%)に関して陽性であり、内皮マーカCD31、単球マーカCD14、および白血球マーカCD45に関して陰性であることを示した(図1A)。RT-PCR解析は、これら細胞が、Myf5、MyoD、およびミオゲニンのような筋原性細胞に関連したマーカを発現することを示した(図1B)。これら細胞が、平滑筋細胞特異的マーカSM22(図1B)およびSMA(図1C)も発現する。しかし、ある特定のアイソフォームの平滑筋細胞が、骨格筋細胞を発育もしくは再生させることにおいて、検出されている(14、15)。これらの細胞が、カルボニン(図1B)およびSM-MHC(図1C)のような分化平滑筋細胞マーカを発現しない。

【0059】

これら細胞が次いで、培養において、VEGF(10ng/mL)を含有する培地に置かれた。7日後、細胞形態における変化が観察された(図2A)。RT-PCR手法が使用され、遺伝子発現の変化を、培養の間、骨格筋細胞と平滑筋細胞との間で比較した。この解析が、細胞から、培養に置いて後、0、6、11もしくは12、および30日に得られたRNAに関して実施され、その結果が、図2Bに与えられている。これら培養条件がどうであれ、この培養期間全体を通して、SM22、ミオゲニン、およびMyf5をコードしている遺伝子が、同様のレベルにおいて発現されたことが観察された。培養においてFGFbと共に置かれた骨格筋細胞(CMS)が全く、カルボニン発現を示さない。しかし、VEGFを用いた培養1ヶ月後、これらの細胞が、カルボニンmRNAを発現し、同時にモはや、MyoDを発現しない(図2B)。SM-MHC発現が、これらの細胞が、平滑筋細胞表現型を採ったことを確かめる(図2C)。平滑筋細胞(CML)における構造遺伝子発現における可変性により、受け入れられた意見は、細胞が分化CMLとして特徴化されるには、平滑筋と関連した幾つかのアイソフォームの構造遺伝子発現が、実証されている必要があるということである。これゆえ、CMSにおける、SM22、カルボニン、およびSM-MHC発現が、その培養におけるある特定の細胞が、分化CMLのアイデンティティを採ったことの強い示唆である。最良の培養条件を画定させるために、CMLの分化もしくは増殖を誘導させると知られた他の成長因子が、テストされた。これゆえ、PDGF BB および/または FGFb および/または HGF および/または TGF および/または IGF1 が、VEGFに加えられた培養条件が、テストされた。しかし、CMLへのCMSの分化への、もしくは、これらの増殖への有意な効果が全く、観察されなかった。

【0060】

Fridd M.G.ら(13)が、成熟牛内皮細胞を含有し、これがin vitroにおいて、CML表現型を、分化転換過程により、獲得できることを示している。ここで、FACS解析により、培養における細胞が、内皮細胞(CE)により混入されていないことが、確認されている。これらが、CD31(図1A)のような内皮細胞に関連したマーカを発現しない。更に、この観察された現象が、外部源からのCMLによる単純な混入でないとの仮説が、肯定され得る。これは、全てのテストされた生検が、骨格筋ミオゲニン、MyoD、Myf5、およびデスミンに関連した遺伝子発現を示すが、平滑筋へと分化していくからである。

【0061】

実施例 3：機能テスト

平滑筋細胞マーカーの獲得が必ずしも、これらの細胞が、成熟 CML へと分化できることを意味しない。

【0062】

A) I 型コラーゲンゲルにおける培養 (3D における培養)

プロトコル：

I 型コラーゲンゲルにおける培養 (3D における培養) (BD Biosciences, Bedford, MA) が、その供給元の推奨に従いながら、実施されたが、つまり、0.5 mL の 1 mg/mL の I 型ラット尾コラーゲン (Becton Dickinson) が、35 mm 直径の培養皿 (Nunc, Fisher Scientific, Ellancourt, France) 中に注がれ、1 時間 37 °C において、重合するよう放置された。合計 400,000 細胞 (内皮細胞が筋細胞と混合されている場合、200,000 の各型の細胞) が次いで、該ゲルの表面上で培養され、培養において 24 時間、異なる培養条件下に置かれた。血管ネットワーク形成が次いで、位相差顕微鏡および << 電荷組み合わせ >> ビデオカメラ Kappa CF 11 DSP を用いて観察された。

【0063】

結果 (図 3A ~ 3C 参照)：

それ自体を 3D コラーゲン構造において組織化させることができる細胞の能力が次いで、解析された。これら内皮細胞 (CE) および CML が、互いと相互作用し、毛管型ネットワークを、in vitro において、3D 培養において、形成することが示された。CE と会合して毛管ネットワークを in vitro において形成できる、FGFb を用いて培養された CMS、および、VEGF を用いて培養された CMS の能力が、比較された。VEGF を用いて培養された CMS が、CE と相互作用でき、コンパクトな管状ネットワークを形成していく一方 (図 3C)、FGFb を用いて培養された CMS が、同一条件において CE と相互作用せず、全く血管ネットワークを形成しない (図 3B 参照) ことが、観察された。

【0064】

B) マトリゲル (matrigel) モデル

NOD - SCID 免疫抑制マウスにおけるマトリゲル移植モデルにおける管型血管構造を形成できる各細胞型、FGFb を有するかもしれない VEGF を有する CMS の能力が、テストされた。

プロトコル：

J0：0.2 mL の Matrigel 移植片 (BD Biosciences) (0.5 mg/mL FGFb 含有) が、NOD - SCID 免疫抑制マウスの背中において、皮下注射された。

J1：午前中、これらマウスが、致死量を下回り、照射された (325 rad)。午後、500,000 細胞が、尾静脈経路で、静脈内注射された。

J10：これら動物が、犠牲にされ、該移植片が回収され、パラフィン中に埋められた。HES (ヘマリン、エオシン、サフラニン) 染色がなされ、観察された (拡大率 4 倍、40 倍)。

【0065】

結果 (図 4A ~ 4C 参照)：

これらの結果が、3 人の異なる患者起源の、もしくは、5 人の異なる患者の生検からの、CMS に関して得られ、再現された。

【0066】

Matrigel 移植において、VEGF を用いて培養された、CE と CML との、もしくは、CE と CMS との投与が、多くの管型の構造体形成に至り、赤血球の存在が、光の下に表され、機能的な血管構造の存在を実証している (図 4B および 4C)。逆に、FGFb と共に培養された CE と CMS との投与が、如何なる管型構造形成にも至らず、非組織化された細胞凝集形成を引き起こす (図 4A)。

【 0 0 6 7 】

C) VEGF 存在下に培養された CMS がもはや、多核筋管において合着しない (図 5 A ~ 5 F 参照)

多核筋管への個々の筋芽細胞の合着が、CMS 終末分化を構成する。筋管形成が、CMS を FGF b もしくは VEGF と共に同一初期濃度において培養し、次いで、これら培養条件を、2 % 牛胎児血清を有する培地に変更することにより、観察された。これらの条件において、筋管が、培養に入れた 10 日後、現れた。FGF b と共に培養された CMS に対して (図 5 B)、VEGF と共に培養された CMS (図 5 D) が、CML (図 5 F) のように、多核筋管へと合着していくことが、できない。こうして、これらの細胞が、多核筋管を形成できる能力を失ってしまった。

【 0 0 6 8 】

D) VEGF が、血清応答因子 FRS (< serum response factor >) に関して SRF とも命名) 発現を増加させることにより、CML 表現型への CMS 表現型の遷移を誘導することに関与している

VEGF が、体の成長の間および成人における血管形成の主要なレギュレーターである。VEGF に関する考えられるシグナル伝達経路を探るために、VEGFR 1 および VEGFR 2 受容体発現が、CMS および CML において解析された。RT-PCR 解析が、CMS が、大量の VEGFR 2 を発現することを示した。しかし、これらの細胞が、VEGF を含有する培地において培養されている場合、VEGFR 2 発現の減少が観察された (図 6)。そして、これら培養条件が、何であれ、我々が、VEGFR 1 発現の検出を示していない。これゆえ、これらの結果が、VEGF により刺激された CML への CMS の分化転換の媒介における VEGFR 2 の役割を、示唆する。FRS が、細胞成長および分化において関与していると知られている多くの細胞の早期応答遺伝子の、鍵となるレギュレーターである。ある幾つかの結果が、CMS もしくは CML 株に拘束された 1 種もしくは複数種の FRS 共因子が、FRS と一緒に機能し得、株特異的遺伝子の転写を活性化させることを示唆する。CML への CMS の分化において参画する作用機序 (メカニズム) を理解するために、FRS 発現が、VEGF 添加前後、これら細胞において比較された。CMS が、VEGF を含有する培地において培養されている場合、FRS mRNA 発現が、上昇したことが観察された (図 6)。

【 0 0 6 9 】

【表 1】

- 1: Gussoni E. et al. : Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999, 401:390-394.
- 2: Jackson KA. Et al. From the cover : hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *PNAS* 1999, 96:14482-14486.
- 3: Tamaki T. et al. : Identification of myogenic-endothelial progenitor cells in the interstitial spaces of skeletal muscle. *J Cell Biol* 2002 ; 157:571-577.
- 4: Hwang JH. et al. : Differentiation of stem cells isolated from rat smooth muscle. *Mol Cells* 2004 ; 17(1):57-61.
- 5: Benjamin L.E. et al. : Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999 ; 103:159-165.
- 6: Morikawa S. et al. : Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* 2002 ; 160:985-1000.
- 7: Berger M. et al. : Regulator of G protein signaling-5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. *Blood* 2004 epub le 30/09/04.
- 8: Bergers G. et al. : benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003 ; 111:1287-1295.
- 9: Jain R.K. : Normalizing of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005 ; 307:58-62.
- 10: Ganss R. et al. : Combination of T-Cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. *Cancer Res* 2002 ; 62:1462-1470.
- 11: Rajantie L. et al. : Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 2004 ; 104:2084-2086.
- 12: Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 1078-1083 (2003).
- 13: Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelium-mesenchymal transdifferentiation. *In vitro analysis.* *Circ. Res.* 90, 1189-1196 (2002).

【 0 0 7 0 】

【表 2】

- 14: Li L, Miano JM, Cserjesi P, Olson EN. SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. *Circ. Res.* 78, 188-195 (1996).
- 15: Woodcock-Mitchell J, Mitchell JJ, Low RB, Kieny M, Sengel P, Rubbia L, Skalli O, Jackson B, Gabbiani B. α -Smooth muscle actin is transiently expressed in embryonic rat cardiac and skeletal muscles. *Differentiation* 39, 151-166 (1998).
- 16: Le Ricousse-Roussanne S, Barateau V, Contreres JO, et al. Ex vivo differentiated endothelial and smooth muscle cells from human cord blood progenitors home to the angiogenic tumor vasculature. *Cardiovas. Res.* 62, 176-184 (2004).

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図 1 - 1】 FGFb を含有する培地において培養された骨格筋細胞の特徴化。(図 1 A) フローサイトメトリ解析は、これらの細胞が、CD56、デスミン、および CD90 を発現するが、CD31、CD14、および CD45 を発現しないことを示す。各ヒストグラムにおいて、その黒い線が、ネガティブコントロールの抗体を用いて標識された細胞に対応する。その破線が、各ヒストグラムに関して指し示されたマーカーに対して特異的な抗体を用いて標識された細胞に対応する。これらのヒストグラムが、6 サンプルの代表である。(図 1 B) RT-PCR 解析。(図 1 C) 免疫細胞化学解析による培養骨格筋細胞の特徴化。これら細胞が、抗 IgG コントロール抗体、抗 SMA 抗体、もしくは抗 SM-MHC を用いて標識され、次いで、過酸化酵素を用いてカップリングされた 2 次抗体を用いて標識化している。

【図 1 - 2】 FGFb を含有する培地において培養された骨格筋細胞の特徴化。(図 1 A) フローサイトメトリ解析は、これらの細胞が、CD56、デスミン、および CD90 を発現するが、CD31、CD14、および CD45 を発現しないことを示す。各ヒストグラムにおいて、その黒い線が、ネガティブコントロールの抗体を用いて標識された細胞に対応する。その破線が、各ヒストグラムに関して指し示されたマーカーに対して特異的な抗体を用いて標識された細胞に対応する。これらのヒストグラムが、6 サンプルの代表である。(図 1 B) RT-PCR 解析。(図 1 C) 免疫細胞化学解析による培養骨格筋細胞の特徴化。これら細胞が、抗 IgG コントロール抗体、抗 SMA 抗体、もしくは抗 SM-MHC を用いて標識され、次いで、過酸化酵素を用いてカップリングされた 2 次抗体を用いて標識化している。

【図 2】 (図 2 A) FGFb もしくは VEGF を含有する培地における骨格筋細胞 (CMS) の形態学。(図 2 B) FGFb もしくは VEGF を含有する培地において培養された CMS における、骨格筋および平滑筋細胞特異的遺伝子発現の RT-PCR 解析。これら培養物が回収され、RNA を、指し示された異なる時間において調製した。RT-PCR が実施され、その PCR 産物が、臭化エチジウムを含有するアガロースゲル上で解析された。(図 2 C) VEGF を用いて 1 ヶ月間培養された CMS における免疫標識化による SM-MHC 発現の検出。これら細胞が、抗 IgG コントロール抗体もしくは抗 SM-MHC 抗体を用いて標識化され、次いで、過酸化酵素 (ペルオキシダーゼ) とカップリングされた 2 次抗体を用いて標識化された。

【図 3】 位相差顕微鏡を用いて撮られた写真。これら内皮細胞 (CE) およびこれら筋細胞と一緒に、コラーゲンゲル表面上で培養されている。24 ~ 48 時間後、CE が、臍帯血前駆体の分化を起源とする CML (図 3 A)、もしくは、骨格筋細胞を培養した後得られた CML (図 3 C) と相互作用し、ネットワークを形成する。対照的に、CMS が、ネットワークを、これらの条件において、形成できない (図 3 B)。

【図4】マトリゲル (Matrigel) セクション (区画)、HES 標識化。骨格筋細胞から得られたCEおよびCMLの同時注入が、赤血球存在下で、移植片における血管湖の形成に至る (図4B) (全ての点が、これら矢印のレベルであり、図4Cは、より大きい拡大率である)。反対に、これらの同一条件において、CMSが、機能的な血管ネットワークを形成しない (図4A)。

【図5】位相差顕微鏡を用いて撮られた、20%牛胎児血清 (SVF) (図5A、5C、および5E) もしくは2%SVF (図5B、5D、および5F) を含有する培地において培養されたCMS (図5A～5D) およびCML (図5Eおよび5F) の写真。筋管への細胞形成を誘導させるために、80～90%の集密度に到達している細胞の培養培地が、2%SVFを用いて補完された培地に変えられている。筋管形成停止が、該培地へのVEGFの添加に関している (図5C～5F)。VEGF存在下に培養されたCMSが、多核筋管へと合着できない (図5D)。

【図6】CMLの分化の度合いが、VEGFR2の発現の減少および血清応答因子 (FRS) の発現の増加と相関されている。FGFbもしくはVEGF存在下に培養されたCMSの3種の異なるサンプルのRT-PCR解析 (1、2、および3)。内皮始原細胞 (CPE) が、(16)において記載のように得られたが、VEGF受容体 (VEGFR) 発現に関するポジティブコントロールとして、FRSに関するネガティブコントロールとして、使用されている。培養条件が何であれ、CMSおよびCMLが、VEGFR1を発現しない。CMSにおいて、VEGFが、VEGFR2発現を減少させるが、FRSmRNA発現を刺激する。